

Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale

Bactériologie

12BAC2

octobre 2012

Antibiogramme *Enterobacter cloacae*

Recherche mycobactéries sur frottis d'expectorations à colorer

Recherche ADN ou ARN de *Chlamydia trachomatis* par amplification génique

Avril 2014

Christophe de CHAMPS (Reims)
Gérard LINA (Lyon)
Muriel FROMAGE (Ansm)

Expédition : 24 octobre 2012

Clôture : 19 novembre 2012

Edition des compte-rendus individuels : 30 janvier 2013

Paramètres contrôlés :

Antibiogramme : *Enterobacter cloacae*

Recherche de mycobactéries sur frottis d'expectorations

Recherche d'ADN ou d'ARN de *Chlamydia trachomatis* par amplification génique

Nombre de laboratoires concernés* : 1665

Nombre de laboratoires participants** : 1564

* Laboratoires ayant déclaré à l'ANSM pratiquer au moins une des analyses concernées par l'envoi

** Laboratoires ayant retourné un bordereau-réponse correctement identifié par le code laboratoire, avant la date de clôture de l'opération

Résumé de l'opération

Cette opération comportait deux souches lyophilisées d'*Enterobacter cloacae* : l'une, hyperproductrice de céphalosporinase et l'autre, productrice d'une BLSE (SHV-12) en plus de la céphalosporinase chromosomique hyperproduite.

Pour la première souche, 87% des laboratoires participants ont signalé la présence d'une céphalosporinase de haut niveau. Cependant, ce bon score doit être tempéré par le fait que parmi eux, un sur cinq a également signalé la présence d'une BLSE, alors qu'aucune des différentes méthodes reconnues de détection des BLSE ne permettait de mettre en évidence la présence d'une BLSE. Enfin, 9% ont rendu uniquement « BLSE ».

Pour la seconde souche, 37% des laboratoires ont détecté la présence concomitante des deux mécanismes de résistance. La même proportion de laboratoires a signalé la présence d'une céphalosporinase de haut niveau. Enfin, 22% ont rendu « BLSE » sans évoquer la céphalosporinase hyperproduite.

Cet envoi comportait également deux frottis d'expectorations fixés à colorer, pour recherche de bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR). La moitié des laboratoires inscrits pour cette analyse a reçu un frottis négatif et un frottis positif faible (1+), tandis que l'autre moitié a reçu deux frottis positifs (2+) et (3+).

En ce qui concerne le frottis négatif coloré et lu par 273 laboratoires, trois participants ont rendu « présence de BAAR 1+ » (erreur mineure) et deux participants « présence de BAAR 2+ ou 3+ » (erreur majeure). Le frottis positif faible a conduit à 41 faux négatifs (erreur mineure).

Pour les deux frottis franchement positifs (2+ et 3+), on note respectivement 29 et 11 faux négatifs. Répondre « absence de BAAR » sur ce type de frottis est une erreur majeure. Néanmoins, seuls quatre laboratoires (1,4%) posent problème car ils ont rendu « absence de BAAR » sur les deux échantillons positifs.

Enfin, concernant le diagnostic direct de *Chlamydia trachomatis*, suite à la suppression dans la NABM, le 04/11/2011, des techniques directes par culture cellulaire, par méthodes immunologiques (ELISA, immunochromatographie) et par hybridation au profit de la recherche d'ADN ou d'ARN par amplification génique, nous avons adressé aux 249 laboratoires ayant déclaré réaliser cette analyse deux échantillons lyophilisés.

La moitié des laboratoires a reçu un échantillon négatif et un positif moyen, tandis que l'autre moitié a reçu un positif faible et un positif moyen. Sur 122 résultats, on note deux faux positifs pour l'échantillon qui ne contenait pas de *C. trachomatis*. Les résultats sont excellents (0,8% négatifs) pour l'échantillon faiblement positif et étonnamment moins bons pour l'échantillon positif moyen (2,8% négatifs et 5,7% douteux). Ces résultats négatifs et douteux sont dus aux réactifs Becton Dickinson dont la sensibilité n'est pas mise en cause ici puisque l'échantillon le moins dilué conduit à des faux négatifs contrairement à l'échantillon le plus dilué pour lequel aucun faux négatif n'est observé. Dans ce cas, l'hypothèse de la présence dans la suspension mère d'une substance inhibitrice pour les réactifs BD semble la plus probable.

Antibiogramme *Enterobacter cloacae*

Définition des échantillons

Deux échantillons contenant chacun une souche d'*Enterobacter cloacae* lyophilisée ont été proposés. Il était demandé aux laboratoires participants de tester la sensibilité de la souche isolée vis-à-vis de 17 antibiotiques définis. Pour chaque antibiotique testé, le résultat « lu » permet de contrôler la qualité technique de l'antibiogramme tandis que le résultat « transmis » correspond à l'interprétation de l'antibiogramme par le biologiste en présence d'un éventuel mécanisme de résistance. En complément de l'antibiogramme, les laboratoires devaient préciser le(s) phénotype(s) de résistance aux β-lactamines détecté(s), à choisir parmi les phénotypes suivants : pénicillinase haut niveau, TRI (TEM résistante aux inhibiteurs), oxacillinase, céphalosporinase haut niveau (CHN), bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE), carbapénémase.

Les numéros des échantillons ainsi que les résultats des experts - Pr C. de CHAMPS, Reims et Pr G. LINA, Lyon - obtenus pour chacune de ces deux souches par la méthode de diffusion en milieu gélosé sont présentés dans le tableau I. La détermination des CMI lorsqu'elle était nécessaire a été réalisée par la méthode du E-Test et/ou par la méthode de référence.

Les renseignements cliniques qui accompagnaient les échantillons sont les suivants :

« La souche a été isolée d'un dépistage anal pour recherche de bêta-lactamase à spectre étendu chez un patient en réanimation. »

tableau I - antibiogramme des deux souches d'*Enterobacter cloacae* : résultats des experts

N° des échantillons	<i>Enterobacter cloacae</i> (CHN + BLSE)		<i>Enterobacter cloacae</i> (CHN)	
	108, 246, 374, 499, 518, 703, 885, 962		131, 234, 395, 577, 620, 661, 804, 913	
Antibiotiques	Résultat lu	Résultat transmis	Résultat lu	Résultat transmis
Ticarcilline	R	R	R	R
Ticarcilline + ac. clavulanique	R	R	I / R	I / R
Pipéracilline	R	R	S / I / R *	I / R **
Pipéracilline + tazobactam	I / R	I / R	S / I	S / I
Céfalotine	R	R	R	R
Céfoxitine	R	R	R	R
Céfotaxime	R	R	R	R
Ceftazidime	R	R	I / R	I / R
Céfépime	S / I	S / I	S	S
Aztréonam	R	R	S / I	S / I
Imipénème	S	S	S	S
Ertapénème	S / I / R *	S **	S	S
Gentamicine	R	R	S	S
Tobramycine	R	R	I / R	I / R
Amikacine	R	R	S	I ***
Acide nalidixique	R	R	R	R
Ofloxacine	R	R	R	R
* : S / I / R selon le réactif utilisé. Si « I » ou « R » à l'ertapénème avec « S » à l'imipénème, il faut déterminer la CMI. ** : CMI = 0,25 mg/l			* : S / I / R selon le réactif utilisé. ** : Interpréter « I » un résultat « S » aux uréido-pénicillines chez toute entérobactérie « I » ou « R » aux carboxy-pénicillines. *** : interpréter A ¹ un résultat G ^S et T ^{I/R} et A ^{S/I} évoquant la production d'une AAC(6'). Présence d'une AAC(6') confirmée par PCR.	

Résultats des participants

Les réactifs utilisés dans les laboratoires pour la réalisation de l'antibiogramme d'*Enterobacter cloacae* sont détaillés dans le tableau II.

Les résultats obtenus, tous réactifs confondus, sont rapportés pour chacune des deux souches dans les tableaux III et IV.

En complément de l'antibiogramme, les laboratoires devaient préciser le phénotype de résistance aux β -lactamines détecté. Les réponses obtenues pour chaque souche sont rapportées dans les tableaux V et VI. Les réponses attendues apparaissent en gras.

tableau II - antibiogramme *E. cloacae* : techniques et réactifs utilisés

Techniques / Réactifs	effectif
Galleries	28,6%
ATB G - EU bioMérieux *	337
ATB UR EU bioMérieux *	64
Rapid ATB UR EU bioMérieux *	14
Urifast Elitech	2
Automates	48%
VITEK carte non précisée	3
VITEK carte AST N233	223
VITEK carte AST N103	53
VITEK carte AST NSE1	41
VITEK carte AST XN05	212
VITEK carte AST N235	49
VITEK carte AST N234	36
VITEK carte AST N123	4
VITEK carte AST N128	2
Microscan Siemens	34
Phoenix Becton Dickinson	42
Disques	22%
Biorad	249
I2a	46
Oxoid	14
BioMérieux	5
Eurobio	4
Autres divers	2
Réactif non précisé	21 (1,4%)
Total	1457

* : lecture visuelle ou automatisée (ATB expression, mini API)

tableau III - antibiogramme *E. cloacae* (CHN + BLSE SHV-12) : résultats des participants

Antibiotiques	lus				transmis			
	n	S (%)	I (%)	R (%)	n	S (%)	I (%)	R (%)
Ticarcilline	727	0	0,1	99,9	719	0	0	100
Ticarcilline + ac. clavulanique	492	0,4	1	98,6	493	0,4	0,8	98,8
Pipéracilline	582	0	0,5	99,5	585	0	0,9	99,1
Pipéracilline + tazobactam	700	4,3	8,3	87,4	692	2,7	9,3	88
Céfalotine	727	0,1	0	99,9	719	0,1	0	99,9
Céfoxitine	715	0,8	1,4	97,8	707	0,3	0,3	99,4
Céfotaxime	691	0	0,7	99,3	687	0,0	0,4	99,6
Ceftazidime	723	0,3	2,2	97,5	715	0,3	1	98,7
Céfépime	587	30,8	56,9	12,3	577	24,3	41,9	33,8
Aztréonam	387	1,8	4,7	93,5	388	1,5	3,6	94,1
Imipénème	702	98,7	0,6	0,7	691	97,5	1,2	1,3
Ertapénème	497	71,2	9,3	19,5	492	75	7,9	17,1
Gentamicine	730	5,6	0,3	94,1	721	5,7	0,1	94,2
Tobramycine	678	0,4	0	99,6	673	0,3	0,1	99,6
Amikacine	716	2,2	4,3	93,4	708	2	2,4	95,6
Acide nalidixique	702	0,1	0	99,9	699	0,1	0	99,9
Ofloxacine	710	1,7	2,8	95,5	705	1,4	2,4	96,2

tableau IV - antibiogramme *E. cloacae* (CHN) : résultats des participants

Antibiotiques	lus				transmis			
	n	S (%)	I (%)	R (%)	n	S (%)	I (%)	R (%)
Ticarcilline	713	0,3	0,3	99,4	699	0,1	0,1	99,8
Ticarcilline + ac. clavulanique	451	1,1	34,4	64,5	450	0,9	25,8	73,3
Pipéracilline	559	12,1	13,8	74,1	556	2,5	12,2	85,3
Pipéracilline + tazobactam	682	47,7	48,5	3,8	606	27	62,5	10,5
Céfalotine	714	0,3	0	99,7	702	0	0	100
Céfoxitine	703	0,1	0	99,9	690	0,1	0	99,9
Céfotaxime	688	0,4	2,5	97,1	676	0,5	1,6	97,9
Ceftazidime	703	1,3	29,7	69	691	0,9	15,9	83,2
Céfépime	605	94,4	1,8	3,8	596	75,5	4,4	20,1
Aztréonam	387	16,3	80,6	3,1	380	12,9	77,1	10
Imipénème	690	99,3	0	0,7	676	99,3	0	0,7
Ertapénème	466	97,4	1,5	1,1	458	98,7	0,4	0,9
Gentamicine	716	98,2	0,8	1	693	92,8	2,7	4,5
Tobramycine	656	8,1	6,2	85,7	634	8,4	3,6	88
Amikacine	702	96	1,9	2,1	679	67	9,6	23,4
Acide nalidixique	685	0	0,3	99,7	677	0	0,1	99,9
Ofloxacine	695	0,2	0,4	99,4	684	0,1	0,3	99,6

tableau V - antibiogramme *E. cloacae* (CHN + BLSE SHV-12): phénotype de résistance aux β -lactamines ?

	Effectif (%)
Absence de réponse	16 (2,2)
Céphalosporinase haut niveau	251 (34,1)
BLSE	161 (21,9)
Céphalosporinase haut niveau + BLSE	265 (36,0)
Autres (divers)	43 (5,8)
Total	736

tableau VI - antibiogramme *E. cloacae* (CHN): phénotype de résistance aux β -lactamines ?

	Effectif (%)
Absence de réponse	39 (5,4)
Céphalosporinase haut niveau	469 (65,0)
BLSE	61 (8,4)
Céphalosporinase haut niveau + BLSE	125 (17,3)
Autres (divers)	28 (3,9)
Total	722

Commentaires

Deux souches d'*Enterobacter cloacae* ont été adressées aux laboratoires. Le choix a été motivé par l'observation de plus en plus fréquente d'*Enterobacter cloacae* de sensibilité diminuée aux carbapénèmes du fait de l'association de plusieurs mécanismes de résistance sans que ces souches soient pour autant productrices de carbapénémase.

Enterobacter cloacae est producteur d'une céphalosporinase chromosomique codée par le gène *bla*_{AmpC}. Elle est responsable du phénotype naturel de résistance aux céphalosporines de première et deuxième génération et aux aminopénicillines. Elle n'est pas sensible à l'acide clavulanique. Parmi les céphalosporines de deuxième générations, cette céphalosporinase hydrolyse plus la céfoxitine que le céfuroxime.

Des mutations dans les gènes de régulation du gène *bla*_{AmpC} conduisent à une hyperproduction des enzymes entraînant une perte de sensibilité aux carboxypénicillines, uréidopénicillines et céphalosporines de 3^{ème} génération. L'acquisition de cette résistance laisse les souches sensibles aux céphalosporines de 4^{ème} génération notamment au céfépime. Rarement des mutations dans le gène *bla*_{AmpC} peuvent entraîner une résistance au céfépime.

Les souches restent sensibles aux carbapénèmes en l'absence d'acquisition d'un mécanisme de résistance par imperméabilité, par modification ou perte de porine.

Plus récemment ont émergé des *Enterobacter cloacae* ayant acquis une bêta-lactamase à spectre étendu. L'association de ces enzymes à la céphalosporinase chromosomique hyperproduite entraîne une diminution de la sensibilité aux céphalosporines de 4^{ème} génération mais également à l'ertapénème. Il n'y a pas dans ces souches de carbapénémase au sens propre du terme.

1- *Enterobacter cloacae* CHN + BLSE

Ainsi la souche d'*Enterobacter cloacae* du lot n°1 produisait une bêta-lactamase TEM-1, une bêta-lactamase à spectre étendu SHV-12 et la céphalosporinase chromosomique hyperproduite.

Cette souche n'a pas posé de problème aux laboratoires à l'exception de trois molécules : pipéracilline + tazobactam, céfépime et ertapénème (tableau III).

En ce qui concerne l'association pipéracilline/tazobactam, la souche pouvait apparaître soit intermédiaire soit résistante. La majorité des laboratoires utilisant un système Vitek ont rendu « R » (CMI estimée \geq 128 mg/l), de même que 100% des utilisateurs du Phoenix. Des discordances sont observées pour la méthode des disques (disques Biorad : 10,5% « S » / 30,5% « I » / 59% « R »).

Plus gênante était la sensibilité de la souche au céfépime puisque les réponses pouvaient osciller entre sensible ou intermédiaire. Ainsi, 69% des laboratoires utilisant des disques ont rendu sensible et 25% intermédiaire. Pour les utilisateurs du Vitek, on note 80% de réponses « intermédiaire » (CMI estimée = 2 mg/l) et 15% « sensible ».

Enfin, selon la méthode utilisée, la souche pouvait paraître sensible, intermédiaire ou résistante à l'ertapénème. En ce qui concerne les automates (Vitek et Phoenix), la majorité des réponses était « sensible » (83% « S », 5% « I », 12% « R »), tandis que les réponses étaient plus contrastées avec les disques Biorad : 44% « S », 20% « I » et 36% « R ». Cependant, dans le cas où une souche est « I » ou « R » à l'ertapénème et « S » à l'imipénème, il faut déterminer la CMI de l'ertapénème qui était ici égale à 0,25 - 0,5 mg/l, donc inférieure ou égale à la concentration critique basse. Par conséquent, le résultat devait être transmis « sensible ».

En ce qui concerne l'identification du phénotype de résistance aux bêta-lactamines, une bêta-lactamase à spectre étendu pouvait être évoquée parce qu'une synergie était visible entre le disque de céfépime et un disque contenant de l'acide clavulanique (amoxicilline + acide clavulanique ou ticarcilline + acide clavulanique) ou bien entre un disque de ceftazidime et un disque contenant de l'acide clavulanique. Les résistances à la ceftazidime et au cefotaxime étaient telles que la synergie était difficilement visible, elle était un peu plus nette avec l'aztréonam (photo 1).

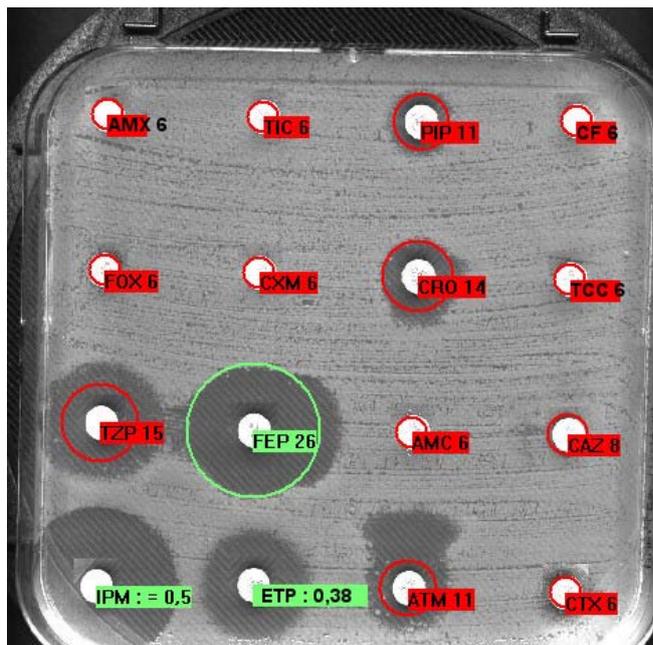


Photo 1 : *Enterobacter cloacae* CHN + BLSE
Antibiogramme sur MH

BLSE => synergie entre le céfépime (FEP) ou l'aztréonam (ATM) et un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC)



Photo 2 : *Enterobacter cloacae* CHN + BLSE
Antibiogramme sur MH additionné de cloxacilline (inhibiteur de la céphalosporinase)

- synergies (« bouchons de champagne ») mieux détectées,
- augmentation du diamètre autour de CTX et CAZ,
- élargissement du diamètre autour de l'ertapénème.

AMX, amoxicilline ; TIC, ticarcilline ; PIP, pipéracilline ; FEP, céfépime ; CF, céfalotine ; AMC, amoxicilline + acide clavulanique ; CAZ, ceftazidime ; TZP, pipéracilline + tazobactam ; FOX, céfoxitine ; CXM, céfuroxime ; TCC, ticarcilline + acide clavulanique ; ATM, aztréonam ; CRO, ceftriaxone ; CTX, cefotaxime ; IPM, imipénème ; ETP, ertapénème.

La céphalosporinase de haut niveau était visible par inhibition de la céphalosporinase par la cloxacilline montrant une augmentation du diamètre autour du céfotaxime ou de la ceftazidime. La cloxacilline permettait

également un élargissement du diamètre de l'ertapénème montrant la participation de la céphalosporinase à la diminution de sensibilité à l'ertapénème (photo 2).

L'analyse des réponses des participants (tableau V) montre que 72% des laboratoires ont trouvé une céphalosporinase de haut niveau, 59% une bêta-lactamase à spectre étendu, mais seuls 37% ont signalé la présence des deux mécanismes de résistance.

Il faut noter que la galerie ATB G- lue sur l'ATB Expression proposait les deux phénotypes de résistance (BLSE ou CHN) alors que le Vitek (cartes AST-N234 et AST-XN05) ne proposait que le phénotype de résistance « céphalosporinase à haut niveau (AmpC) » pour cette souche. En effet, le phénotype BLSE est proposé par l'automate uniquement si la CMI de pipéracilline + tazobactam est strictement inférieure à 128 mg/l ce qui n'était pas le cas avec cette souche (CMI \geq 128 mg/l). Or, ce « raisonnement » n'est valable qu'en présence d'une BLSE seule et devient caduc si, en plus de la BLSE, la souche est hyperproductrice de céphalosporinase. La souche a été adressée à bioMérieux en R&D en vue d'améliorer le système expert.

2- *Enterobacter cloacae* CHN

En ce qui concerne l'*Enterobacter cloacae* du lot n°2 (photo 3), il était producteur d'une céphalosporinase hyperproduite et d'une oxacillinase à spectre étroit. Ces oxacillinases sont habituellement peu ou pas inhibées par l'acide clavulanique.

Les discordances entre les laboratoires sont relativement nombreuses et portent sur les six bêta-lactamines suivantes (tableau IV) :

- la ticarcilline + acide clavulanique avec une CMI = 32 mg/l était attendue « R », mais la réponse « I » qui pouvait être obtenue à une dilution près (16 mg/l) était acceptable. On note respectivement 100%, 86% et 34% de réponses lues « R » pour le Phoenix, la méthode des disques et le Vitek. La majorité des réponses lues « I » proviennent du Vitek (CMI estimée = 16 mg/l).

- la pipéracilline pouvait être lue « S » ou « I » par la méthode des disques, ou bien « R » sur le Vitek ou la galerie G-. Néanmoins, un résultat « S » aux uréido-pénicillines doit être interprété « I » chez toute entérobactérie « I » ou « R » aux carboxy-pénicillines. Par conséquent, la réponse transmise pouvait être « I » ou « R » (97,5% des participants).

- la pipéracilline + tazobactam pour laquelle on observe les discordances les plus importantes entre la méthode des disques et le Vitek : en moyenne 92% des résultats lus « S » par méthode des disques alors que le Vitek rend « I » (CMI estimée 16 mg/l). Ceci est dû au fait que la CMI est égale à la concentration critique basse (8 mg/l). Par conséquent, à une dilution près, la réponse peut être « S » ou « I ».

- la ceftazidime avec une CMI = 6 - 8 mg/l était attendue « R » mais la réponse « I » qui pouvait être obtenue à une dilution près (4 mg/l) était acceptable.

- le céfépime vis-à-vis duquel la souche testée était tout à fait sensible a été transmis « R » par 20% des participants. Il s'agit des utilisateurs de la galerie ATB G- qui corrige à tort « S » en « R ».

- l'aztréonam a été rendu « I » par les automates (Vitek, Phoenix), ce qui était la réponse attendue (CMI = 3 mg/l). Les réponses « S » proviennent des utilisateurs de la méthode des disques (29% des résultats lus « S » avec les disques Biorad).

Parmi les antibiotiques testés autres que les β -lactamines, seuls les aminosides ont posé problème du fait de la présence d'une AAC(6') confirmée par PCR. En effet, selon le CA-SFM, un résultat « G^S et T^{I/R} et A^{S/I} » évoquant la production d'une AAC(6'), l'amikacine lue « S » doit être interprétée « I ».

En ce qui concerne le phénotype de résistance aux bêta-lactamines, rien dans les méthodes de détection des bêta-lactamases à spectre étendu (synergies, méthode des disques combinés, gélose ChromID BLSE...) ne permettait de mettre en évidence la présence d'une BLSE. L'absence de TEM, SHV et CTX-M a par ailleurs été vérifiée par PCR.

Parmi les laboratoires ayant précisé le phénotype de résistance détecté, 87% ont signalé la présence d'une céphalosporinase de haut niveau (CHN), ce qui était exact. Toutefois, parmi eux, un sur cinq a également signalé la présence concomitante d'une BLSE, ce qui était inexact. Enfin, 9% ont rendu « BLSE » seule.

Il faut noter que la galerie ATB G- lue sur l'ATB Expression proposait les deux phénotypes de résistance (BLSE ou CHN) alors que le Vitek (carte AST-N234) proposait uniquement le phénotype « BLSE » car la CMI de la ticarcilline + acide clavulanique estimée à 16 mg/l par l'automate était trop basse (32 mg/l pour le phénotype CHN).

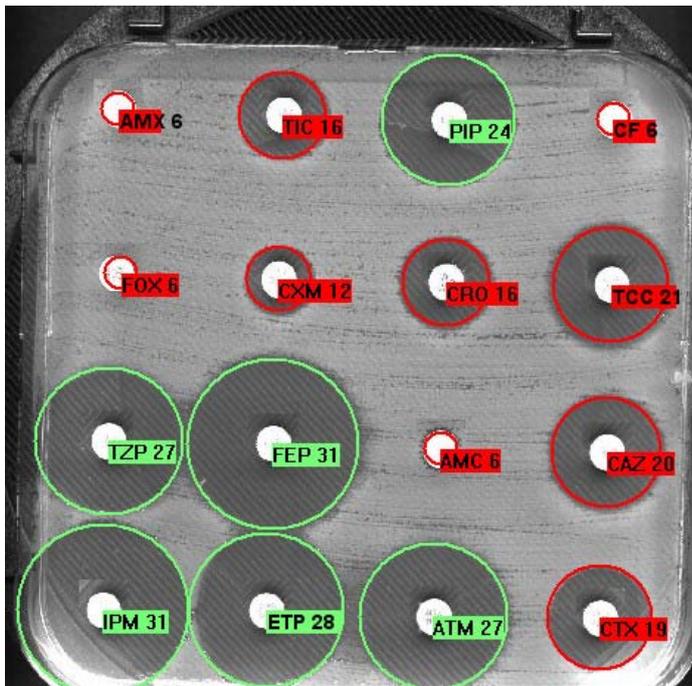


Photo 3 : *Enterobacter cloacae* CHN
Antibiogramme sur MH

Recherche de mycobactéries sur frottis d'expectorations

Définition des échantillons

Quatre lots d'échantillons ont été préparés à partir d'un pool d'expectorations négatives (fluidifiées, décontaminées) inoculé avec une culture de *Mycobacterium gordonae* pour les trois lots positifs. Les frottis ont été fixés à la chaleur. L'homogénéité de chaque lot a été vérifiée sur 5% des lames préparées.

Les quatre lots préparés ont été identifiés : K1/K2, K3/K4, K5/K6 et K7/K8. Chacun des 818 laboratoires ayant déclaré réaliser cette analyse a reçu 2 frottis appartenant chacun à un lot différent : K1/K2 et K3/K4 ou bien K5/K6 et K7/K8.

Il était demandé de rechercher la présence ou l'absence de bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) par une ou deux techniques de coloration (fluorescence et/ou Ziehl-Neelsen). Si deux techniques de coloration successives étaient utilisées, le laboratoire devait préciser le résultat obtenu pour chaque technique.

Enfin, en cas de frottis positif, il était demandé d'indiquer une notion de quantité (de 1+ à 4+) selon la table de codage suivante :

CODE	Ziehl-Neelsen	Fluorescence
1 +	1 à 9 BAAR / 100 champs	1 à 9 BAAR / 10 champs
2 +	1 à 9 BAAR / 10 champs	1 à 9 BAAR / champ
3 +	1 à 9 BAAR / champ	10 à 90 BAAR / champ
4 +	10 à 90 BAAR / champ	> 90 BAAR / champ

Les réponses des experts - Pr C. de CHAMPS, Reims et Pr G. LINA, Lyon - pour les quatre lots sont détaillées ci-dessous :

Echantillon	Résultat qualitatif		Résultat quantitatif			
	Auramine	Ziehl Neelsen	Auramine		Ziehl Neelsen	
			Expert 1	Expert 2	Expert 1	Expert 2
K1 ou K2	Absence	Absence	-	-	-	-
K3 ou K4	Présence	Présence	1+ / 2+	2+	2+	1+
K5 ou K6	Présence	Présence	3+	3+	2+ / 3+	3+
K7 ou K8	Présence	Présence	3+	3+	3+	4+

Résultats des participants

Les résultats qualitatifs (absence ou présence de BAAR) obtenus par les participants sont rapportés pour les quatre frottis K1/K2, K3/K4, K5/K6 et K7/K8 respectivement dans les tableaux VII, VIII, X et XII.

L'estimation quantitative du nombre de BAAR (1+, 2+, 3+ ou 4+) observés par les participants sur les frottis positifs K3/K4, K5/K6 et K7/K8 est détaillée respectivement dans les tableaux IX, XI et XIII.

Pour chacun des quatre lots, l'évaluation des résultats des participants par rapport au résultat attendu (résultat correct, erreur mineure ou erreur majeure) est basée sur la publication «External quality assessment for AFB smear microscopy» disponible sur le site du CDC (<http://stacks.cdc.gov/view/cdc/11440>).

tableau VII - Frottis K1 ou K2 : résultats qualitatifs tous types de coloration confondus (n : 307)

Réponse attendue : absence de BAAR		
Réponses des biologistes		
absence	présence	illisible
289	16 *	2

* : pour 11/16, inversion probable des résultats des 2 échantillons reçus

tableau VIII - Frottis K3 ou K4 : résultats qualitatifs tous types de coloration confondus (n : 319)

Réponse attendue : présence de BAAR			
Réponses des biologistes			
présence	absence	douteux	illisible
265	51*	1	2

* : pour 11/51, inversion probable des résultats des 2 échantillons reçus

tableau IX - Frottis K3 ou K4 : résultats quantitatifs

type de coloration	résultats quantitatifs selon le type de coloration (%)				
	pas réponse	1+	2+	3+	4+
Fluorescence (n : 82)	3,7	74,4	20,7		1,2
Ziehl-Neelsen (n : 183)	0,5	63,4	31,7	3,3	1,1

tableau X - Frottis K5 ou K6 : résultats qualitatifs tous types de coloration confondus (n : 352)

Réponse attendue : présence de BAAR		
Réponses des biologistes		
présence	absence	illisible
321	29	2

tableau XI - Frottis K5 ou K6 : résultats quantitatifs

type de coloration	résultats quantitatifs selon le type de coloration (%)				
	pas réponse	1+	2+	3+	4+
Fluorescence (n : 106)		22,6	43,4	20,8	13,2
Ziehl-Neelsen (n : 214)	0,5	16,3	35,5	29,9	17,8

tableau XII - Frottis K7 ou K8 : résultats qualitatifs tous types de coloration confondus (n : 354)

Réponse attendue : présence de BAAR		
Réponses des biologistes		
résultats qualitatifs tous types de coloration confondus (n : 354)		
présence	absence	illisible
342	11	1

tableau XIII - Frottis K7 ou K8 : résultats quantitatifs

type de coloration	résultats quantitatifs selon le type de coloration (%)				
	pas réponse	1+	2+	3+	4+
Fluorescence (n : 108)		5,5	26,9	62,0	5,6
Ziehl-Neelsen (n : 233)	1,3	3,0	25,3	57,9	12,5

Commentaires

1- frottis K1 ou K2

Sur ce frottis qui ne contenait pas de BAAR, 13% des 273 laboratoires concernés par cet échantillon ont effectué deux types de coloration (fluorescence puis Ziehl), tandis que la majorité des laboratoires (87%) a réalisé un seul type de coloration (Ziehl pour près des trois quarts d'entre eux).

En ce qui concerne la méthode utilisée pour colorer les lames, on note 89% de coloration « manuelle » et 11% de coloration « automatique ».

L'analyse des 307 résultats obtenus tous types de coloration confondus montre 16 faux positifs rendus par 15 laboratoires (un laboratoire a rendu un résultat positif pour la fluorescence et le Ziehl, les 14 autres n'avaient utilisé qu'une coloration) (tableau VII). Dix des 15 laboratoires ont très probablement inversé les résultats des deux échantillons (K1/K2 et K3/K4) techniqués. Les cinq laboratoires restant ont conclu « présence de BAAR » avec pour trois d'entre eux une estimation quantitative égale à 1+ (erreur mineure) et pour deux d'entre eux une estimation égale à 2+ ou 3+ (erreur majeure).

2- frottis K3 ou K4

Les mêmes laboratoires ont reçu le frottis K3 ou K4 et 17% ont effectué un Ziehl pour confirmer le résultat de la fluorescence, soit une légère augmentation (+4%) par rapport à l'échantillon négatif précédent.

On note 51 faux négatifs obtenus par 47 laboratoires (tableau VIII). Si l'on exclut les 10 laboratoires qui ont, a priori, inversé les résultats entre K1/K2 et K3/K4, il reste 37 laboratoires et 41 « vrais » faux négatifs dont le détail est le suivant :

- quatre laboratoires ayant effectué deux types de coloration ont rendu « absence de BAAR » en fluorescence, absence confirmée par le Ziehl,
- cinq laboratoires ayant effectué deux types de coloration ont rendu « présence de BAAR » en fluorescence (quatre « 1+ » et un « 2+ ») et « absence de BAAR » au Ziehl.
- 28 laboratoires ayant effectué une seule coloration (Ziehl : 20, fluorescence : 7, non précisée : 1) ont rendu « absence de BAAR »

Toutefois, s'agissant d'un frottis faiblement positif, ces résultats faussement négatifs sont à considérer comme des erreurs mineures. En effet, l'estimation quantitative réalisée par les laboratoires conduit à 74% « 1+ » / 21% « 2+ » et 63% « 1+ » / 32% « 2+ » respectivement en fluorescence et au Ziehl (tableau IX).

3- frottis K5 ou K6

Les deux frottis positifs K5/K6 et K7/K8 ont été techniqués par 282 laboratoires : 75% des participants ont réalisé une seule coloration (Ziehl pour 80% d'entre eux) et 25% deux colorations (fluorescence puis Ziehl) sur ces frottis positifs, soit 12% de plus que pour le frottis négatif K1/K2.

En ce qui concerne la méthode utilisée pour colorer les lames (manuelle ou automatique), on retrouve exactement les mêmes pourcentages que ceux observés pour les laboratoires qui ont reçu les deux frottis K1/K2 et K3/K4, soit 89% « manuelle » et 11% « automatique ».

On note pour le frottis K5/K6, 29 faux négatifs obtenus par 28 laboratoires (tableau X). Parmi eux, 25 utilisent une seule coloration (fluorescence : 4, Ziehl : 21) et trois utilisent deux colorations. Pour ces derniers, un seul a rendu « absence de BAAR » en fluorescence et au Ziehl ; les BAAR observés par les deux autres en fluorescence (2+ et 3+), n'ont pas été confirmés par le Ziehl.

L'analyse des résultats quantitatifs (tableau XI) montre qu'il s'agit d'un frottis franchement positif (2+ en fluorescence et 2+(3+) au Ziehl). Par conséquent, rendre « absence de BAAR » sur un tel frottis est une erreur majeure.

4- frottis K7 ou K8

Pour le frottis K7/K8 fortement positif (3+ en fluorescence et 3+ au Ziehl) (tableau XIII), on note 11 réponses faussement négatives (tableau XII). Il s'agit là encore d'erreurs majeures. Parmi les 10 laboratoires concernés, huit utilisent une seule coloration (fluorescence : 3, Ziehl : 5) et deux effectuent deux colorations. Pour ces derniers, un a rendu « absence de BAAR » en fluorescence et au Ziehl tandis que l'autre a trouvé le frottis positif en fluorescence (2+) et négatif au Ziehl.

En conclusion, l'analyse détaillée des résultats obtenus par les 282 laboratoires avec les deux échantillons positifs K5/K6 et K7/K8 montrent que seuls quatre laboratoires (1,4%) posent problème car ils ont rendu « absence de BAAR » sur les deux échantillons (soit avec une coloration : 3, soit avec deux colorations : 1). Enfin, un seul laboratoire a rendu pour les deux échantillons « présence de BAAR » en fluorescence et « absence de BAAR » au Ziehl.

Recherche d'ADN ou d'ARN de *Chlamydia trachomatis* par amplification génique *in vitro*

Définition des échantillons

Quatre échantillons lyophilisés identifiés CT1, CT2, CT3 et CT4 ont été proposés. Il s'agissait d'une culture cellulaire (cellules Mc Coy ATCC CRL-1692), soit non infectée (échantillon négatif CT3), soit inoculée avec la souche ATCC VR-901B LGV1 (échantillons positifs CT1, CT2 et CT4). On distingue d'une part CT1 et CT2 qui sont identiques (« positif moyen » : suspension mère diluée au 1/5) et d'autre part CT4 (« positif faible » : suspension mère diluée au 1/50).

Quelle que soit la technique utilisée pour la recherche de *C. trachomatis*, le lyophilisat devait être repris par 0,5 ml d'eau distillée et homogénéisé (vortex 5 secondes). Une fois l'échantillon reconstitué et homogénéisé, 100 µl (prise d'essai simulant un écouvillon) étaient repris par le milieu de transport selon les indications données par le fabricant dans la notice d'utilisation pour le traitement des prélèvements endocervicaux sur écouvillon.

Les 249 laboratoires ayant déclaré réaliser cette analyse ont reçu 2 échantillons : CT1 et CT3 ou bien CT2 et CT4. Il était demandé de rechercher sur chaque échantillon, la présence ou l'absence de *Chlamydia trachomatis* par une ou deux techniques d'amplification.

Résultats des participants

L'ensemble des laboratoires inscrits pour cette analyse ont renvoyé leur bordereau réponse dans les délais. Parmi eux, 13 ont indiqué qu'ils n'effectuaient plus cette analyse.

Le bilan des réactifs employés par les 236 laboratoires montre que la majorité d'entre eux utilisent une seule technique de dépistage (seuls 9 laboratoires utilisent deux réactifs).

Les réactifs les plus utilisés sont, par ordre de fréquence décroissant (tableau XIV) : le Cobas TaqMan (25%), le RealTime CT/NG (13%), le BD ProbeTec ET Chlamydia trachomatis (11%) et le Cobas 4800 CT/NG (9%). On note également que 11 laboratoires utilisent des PCR « maison ».

Pour chacun des 4 échantillons, les réponses des laboratoires tous réactifs confondus sont indiquées dans le tableau XV.

Pour l'échantillon positif CT1/CT2, la répartition des réponses pour les réactifs ayant rendu des résultats autres que « positif » est détaillée dans le tableau XVI.

tableau XIV - réactifs utilisés

code	réactif	distributeur	total
RCAA	RealTime CT	ABBOTT	7
RCAB	RealTime CT/NG	ABBOTT	32
RCCA	Amplix Chlamydia trachomatis	ALL DIAG	6
RCDA	BD ProbeTec ET Chlamydia trachomatis	BECTON DICKINSON	26
RCDB	BD ProbeTec ET Chlamydia trachomatis et Neisseria gonorrhoeae	BECTON DICKINSON	1
RCDC	BD ProbeTec Chlamydia trachomatis CT Q ^x	BECTON DICKINSON	1
RCEA	GenoQuick CT	BIOCENTRIC	10
RCHA	DX CT/NG/MG Assay	BIO-RAD	6
RCKA	Chlamydia trachomatis / Neisseria gonorrhoeae Real-Time PCR	DIAGENODE	2
RCMA	CHLAMYDIA tr. Q-PCT Alert kit	ELITECH	6
RCOA	Test APTIMA CT	GEN-PROBE	1
RCOB	Test APTIMA Combo 2	GEN-PROBE	12
RCRA	Duplica Real Time Advanced Dual Easy Kit Chlamydia trachomatis	ORGENTEC	6
RCSA	Artus C.trachomatis Plus LC PCR Kit	QIAGEN	3
RCSB	Artus C.trachomatis Plus RG PCR Kit	QIAGEN	1
RCTA	Cobas 4800 CT/NG test	ROCHE DIAG.	22

RCTB	Cobas TaqMan CT test V2.0	ROCHE DIAG.	62
RCTC	Cobas Amplicor CT test	ROCHE DIAG.	11
RCUA	Test VERSANT CT/CG DNA 1.0 (kPCR)	SIEMENS	2
RCWA	Nuclisens easyQ basic Kit	BIOMERIEUX	10
RCXA	Xpert CT/NG genexpert	CEPHEID	4
RCZA	Chlamydia trachomatis RT PCR	DIAGENODE	2
RCPD	réactif maison		11
RCXX	réactif non précisé		1
Total			245

tableau XV - réponses des laboratoires tous réactifs confondus

Echantillon	Réponse attendue	Positif (%)	Négatif (%)	Douteux (%)	« Inhibiteur » (%)	total
CT1	positif	109 (89,3)	3 (2,5)	9 (7,4)	1 (0,8)	122
CT2	positif	116 (92,8)	4 (3,2)	5 (4,0)		125
CT3	négatif	2 (1,6)	119 (97,6)	1 (0,8)		122
CT4	positif	122 (99,2)	1 (0,8)			123

tableau XVI - échantillon CT1/CT2 : répartition des réponses autres que « positif »

réactif	Positif	Négatif	Douteux	Inhibiteur	total
BD ProbeTec ET C.trachomatis	7	5	13	1	26
BD ProbeTec ET C.trachomatis et N. gonorrhoeae			1		1
Test APTIMA Combo 2	6	1			7
GenoQuick CT	4	1			5
total	17	7	14	1	39

Commentaires

Les techniques utilisées pour le diagnostic direct de *Chlamydia trachomatis* ont évolué dans le temps. Au début des années 60, seule la culture cellulaire était disponible. Ensuite sont apparues l'immunofluorescence directe, puis les tests ELISA et les tests immunochromatographiques sur membrane, suivis à la fin des années 80 par les tests d'hybridation sans amplification et au début des années 90 par les tests de biologie moléculaire (PCR, TMA, SDA).

Ces derniers sont rapidement devenus la technique de référence pour toutes les formes cliniques d'infection et tous les types d'échantillons. C'est pourquoi, suite à un avis de la HAS en juillet 2010, les recherches directes par culture, par méthode immunologique ou par hybridation ont été supprimées le 04/11/2011 de la nomenclature au profit de la recherche d'ADN ou d'ARN par amplification génique *in vitro* (acte 5257).

Les résultats de cette opération de contrôle sont globalement bons. En ce qui concerne l'échantillon négatif CT3, on note seulement deux résultats faussement positifs et un résultat douteux provenant de trois réactifs différents. Il ne s'agit pas d'une inversion de résultats entre les deux échantillons traités : CT3 (négatif) et CT1 (positif).

Les résultats sont également excellents (un unique faux négatif) avec l'échantillon positif faible CT4.

En revanche, les résultats sont un peu moins bons avec l'échantillon positif moyen CT1/CT2. Les 14 conclusions « douteux » sont dues aux réactifs Becton Dickinson : BD ProbeTec ET *C.trachomatis* (13/14) et BD ProbeTec *C.trachomatis* et *N.gonorrhoeae* (1/14). De même, les 7 faux négatifs proviennent en majorité du BD ProbeTec ET *C.trachomatis* (5/7).

L'industriel, contacté par l'ANSM, a testé dans ses laboratoires de contrôle les trois échantillons positifs confirmant les résultats de ses clients à savoir la positivité de CT4 et la négativité de CT1 et CT2. L'origine de cette anomalie n'a pas été trouvée. Toutefois les réactifs BD ne sont pas mis en cause. En effet, il ne s'agit pas d'un défaut de sensibilité car l'échantillon le plus dilué sort « positif ». On peut évoquer la présence d'une substance inhibitrice dans la suspension cellulaire mère ; ce qui expliquerait que l'échantillon le moins dilué conduise à des faux négatifs contrairement à l'échantillon le plus dilué pour lequel aucun faux négatif n'est observé.